ÉVOLUTION DE LA FLORE LEVURIENNE AU COURS DU TRAITEMENT DES ORDURES MÉNAGÈRES

F. HINZELIN*, F.H. JACOB, J. PERRIER et M.C. VERNER**

* Laboratoire de Cryptogamie, UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, B.P. 403 - 5, rue Albert Lebrun, 54001 - Nancy Cedex - France.

** Laboratoire de Microbiologie Physiologique et appliquée, Université de Lyon I, 43 Bd du 11 Novembre 1918, 69622 - Villeurbanne Cedex - France.

RÉSUMÉ - La population de levures au cours du traitement des ordures ménagères a été étudiée. 44 espèces ont été isolées et identifiées. Les plus fréquemment rencontrées sont *Candida famata, Candida lambica, Rhodotorula rubra* et *Candida haemulonii.* Les ordures ménagères contiennent un grand nombre de levures mais ce nombre diminue considérablement après la digestion en anaérobiose et après divers autres traitements. Le compost de 8 semaines présente encore une population levurienne importante et les espèces les plus fréquentes de levures des ordures ménagères y sont retrouvées.

ABSTRACT - Yeast population of urban wastes and products of their anaerobic treatment have been examined. 44 species have been isolated and identified. The most frequently found were *Candida famata, Candida lambica, Rhodotorula rubra* and *Candida haemulonii.* Urban wastes contain a great number of yeasts but a few number remain after methanization and after other stages of the treatment process. In a eight-week-old compost there is also an important yeast population and the most frequent yeasts of urban wastes were also found here.

MOTS CLÉS : digestion anaérobie, compost, ordures ménagères, levures.

INTRODUCTION

De nos jours l'accumulation des ordures ménagères pose un problème difficile à résoudre (Dorfmann & Batsch, 1985). Parmi les solutions possibles non seulement la digestion anaérobie entraîne une bonne dépollution organique, mais permet aussi d'obtenir une production énergétique sous forme de biogaz contenant environ 60% de méthane et un engrais organique très utile en agriculture.

Les ordures ménagères contiennent une population microbienne très importante tant au plan quantitatif que qualitatif, avec une forte fraction fongique, en particulier levurienne. Il est intéressant de quantifier et d'identifier les différentes composantes de cette zymoflore et de suivre son évolution durant les étapes successives du traitement des ordures ménagères (Jacob et al., 1986).

Ce travail consiste donc à identifier et quantifier les levures isolées à partir d'échantillons d'ordures ménagères et des produits issus des différentes étapes de la digestion anaérobie. Comparativement les tests sont également faits sur du

compost âgé de 8 semaines, produit à partir des ordures ménagères triées analogues à celles introduites dans le digesteur. Il s'agit dans ce cas d'un traitement aérobie (Segura, 1984). Les échantillons provenant de l'Unité de méthanisation de Valorga Process (La Buisse, 38, France) sont prélevés et analysés pendant une période de six mois.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I - Unité de procédé de méthanisation

Il apparait nécessaire de décrire brièvement le procédé du traitement (Perrier et al., 1988) (Fig. 1 et 2).

Les ordures sont mélangées continuellement avec du jus pressé afin d'obtenir le digestat (30% matière sèche) utilisé pour obtenir une fermentation anaérobie optimale.

Le temps de séjour du digestat en condition mésophile (37°C) dans le réacteur est de 21 jours. Le mélange est assuré par une réinjection sous pression du biogaz produit qui en favorise l'homogénéisation.

Après digestion, les boues sont retirées du fermenteur et pressées pour obtenir "un gâteau" (pressat) contenant environ 60% de matière sèche. Le jus issu du pressage est recyclé dans le mélangeur. Le pressat est ensuite émotté

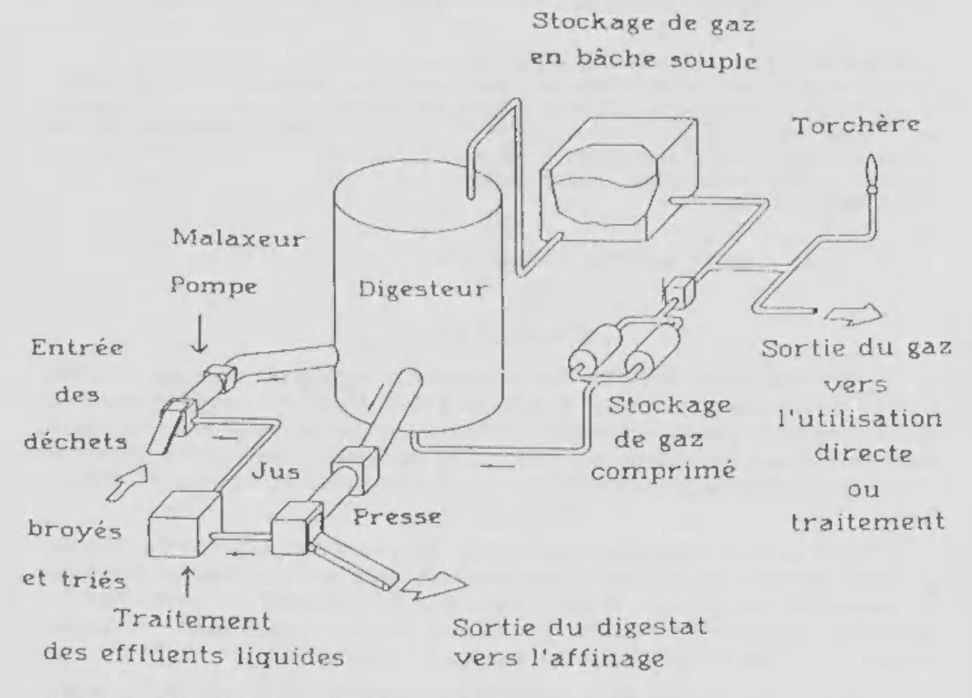


Figure 1: schéma de l'unité de méthanisation du procédé Valorga.

Figure 1: scheme of methanization unit Valorga process.

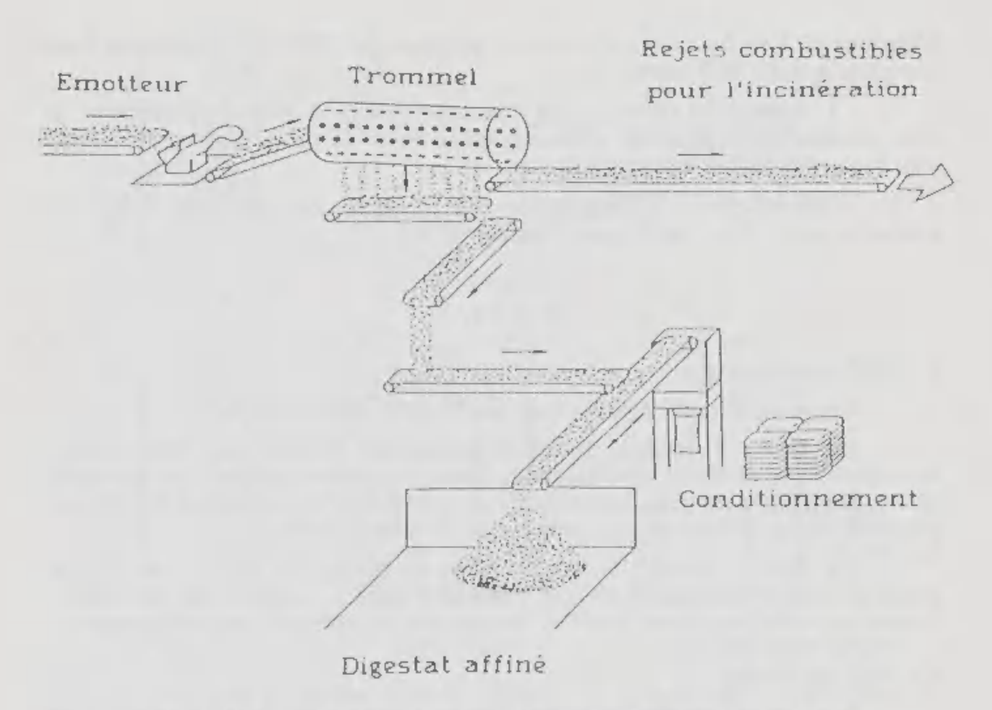


Figure 2: schéma du procédé d'affinage et de conditionnement du digestat affiné.

Figure 2: scheme of the storage and processing of refused digestate.

pour favoriser les opérations ultérieures d'affinage. Le biogaz produit est dirigé vers un gazomètre souple pour être ensuite distribué dans les réseaux d'alimentation.

2 - Echantillonnage

L'hétérogénéité des produits à analyser nécessite un échantillonnage méthodique. Les échantillons d'ordures ménagères, de compost et de digestat affiné sont prélevés selon la méthodologie préconisée par l'ANRED. Le digestat est prélevé en cours de recyclage lors de l'alimentation du digesteur, tandis que les prélèvements de jus et de pressat sont effectués en sortie de presse.

Les échantillons sont placés dans des récipients stériles, transportés en glacière et traités dès leur arrivée au laboratoire.

3 - Techniques

L'isolement des levures est effectué selon le protocole décrit ci-après et selon les techniques classiques de Kreger Van Rij (1984).

- **Numération:** 10g de chaque échantillon frais sont mélangés à 100ml d'une solution aqueuse de pyrophosphate de sodium à 0,1%. Après 15 minutes d'agitation, des suspensions-dilution successives au 1/10ème sont effectuées. Puis 0,1ml de chaque dilution est déposé aseptiquement sur trois boîtes de Pétri contenant un milieu nutritif (extrait de malt 15g/l, glucose 20g/l, gélose 15g/l, pH 4,5) additionné de chloramphénicol (40mg/l) pour inhiber la croissance

bactérienne. Les boîtes sont incubées à l'étuve à 25°C. Les colonies sont comptées après 3 et 7 jours.

- **Isolement:** les colonies sont examinées macro et microscopiquement, et trois colonies de chacun des différents types observés sur les boîtes de culture sont repiquées sur un milieu d'entretien.

- **Identification:** l'identification des espèces est effectuée selon les méthodes préconisées par Kreger Van Rij (1984).

RÉSULTATS

1 - Etude quantitative

Les analyses ont été faites entre juillet 1985 et mars 1986.

La figure 3 indique le nombre total de levures dans les ordures ménagères. Les résultats sont exprimés par g de matière fraîche. Les quantités de matière sèche sont respectivement pour: juillet 45,7%, septembre 47,3%, octobre 47,5%, novembre 46,6%, janvier 53,7% et mars 52%.

La figure 4 montre le minimum et maximum de cellules de levures trouvées dans le digestat, le pressat, l'affinat et dans le compost âgé de huit semaines au cours des 6 mois pendant lesquels ont été effectués les prélèvements.

2 - Etude qualitative

Les ordures ménagères sont riches en levures qui appartiennent aux 44 espèces identifiées dont voici la répartition systématique:

2.1 ASCOMYCOTINA

HÉMIASCOMYCÈTES

ENDOMYCÉTALES

SACCHAROMYCÉTACÉES

SACCHAROMYCÉTOIDÉES

Pichia membranaefaciens

Saccharomyces cerevisiae

2.2 DEUTEROMYCOTINA

A - BLASTOMYCÈTES

CRYPTOCOCCACÉES

1 - Genre *Brettanomyces*

Brettanomyces custersianus Van der Walt (1961)

2 - Genre *Candida*

Candida azyma (Van der Walt, Johannsen et Yarrow) Meyer et Yarrow (Van der Walt et al., 1978)

Candida catenulata Diddens et Lodder (1942)

Candida curvata (Diddens et Lodder) Lodder et Kreger Van Rij (1952)

Candida diddensiae (Phaff, Mrak et Williams) Fell et Meyer (1967)

Candida domercqii (Van der Walt et Van Kerken) Meyer et Yarrow

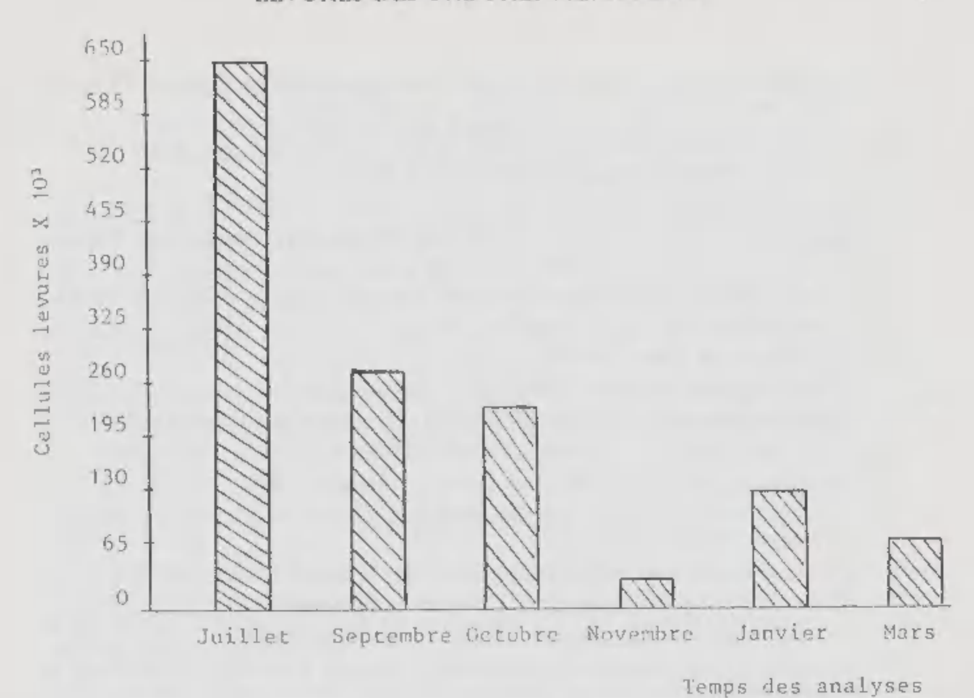


Figure 3: évolution de la quantité totale de levures des ordures ménagères en fonction des dates de prélèvements (nombre de cellules par g de poids frais).

Figure 3: evolution of the quantity of yeasts in urban wastes (number of cells per g of fresh weight).

	NOMBRE DE LEVURES/g.
Ordures ménagères	35000 → 650000
Digestat	200 → 7600
Pressat	150 → 1000
Affinat	0 → 100
Compost âgé de 8 semaines	10000 → 50000

Figure 4: minimum et maximum de cellules levures trouvées dans les différents substrats analysés.

Figure 4: minimum and maximum of yeasts cells found in the different analyzed substrats.

Candida ernobii (Lodder et Kreger Van Rij) Meyer et Yarrow (Yarrow et Meyer, 1978)

Candida famata (Harrison) Meyer et Yarrow (Yarrow et Meyer, 1978)

Candida fermenticarens Van der Walt et Baker

Candida globosa Yarrow et Meyer

Candida haemulonii (Van Uden et Kolipinski) Meyer et Yarrow (Yarrow et Meyer, 1978)

Candida holmii (Jorgensen) Meyer et Yarrow (Yarrow et Meyer, 1978)

Candida inconspicua (Lodder et Kreger Van Rij) Meyer et Yarrow (Yarrow et Meyer, 1978)

Candida ingens Van der Walt et Van Kerden (1961 c)

Candida intermedia (Ciferri et Ashford) Langeron et Guerra (1938)

Candida ishiwadae Sugiyama et Goto (1969)

Candida kefyr (Beijerinck) Van Uden et Buckley (1970)

Candida krusei (Kockova-Kratochvilova) Meyer et Yarrow (Yarrow et Meyer, 1978).

Candida lambica (Linder et Genoud) Van Uden et Buckley (1970)

Candida lipolytica (Harrisson) Diddens et Lodder

Candida maltosa Komagata, Nakase et Katsuya (1964)

Candida membranaefaciens (Lodder et Krager Van Rij) Wickerham et Burton (1954)

Candida mogii Vidal-Leiria (1967)

Candida parapsilosis (Ashford) Langeron et Talice (1932)

Candida pintolopesii (Van Uden) Meyer et Yarrow (Yarrow et Meyer, 1978)

Candida rhagii (Diddens et Lodder) Jurzitza, Kuhlwein et Kreger Van Rij (1960)

Candida rugosa (Anderson) Diddens et Lodder (1942)

Candida sake (Saito et Ota) Van Uden et Buckley (1970)

Candida silvicola Shifrine et Phaff

Candida sp.

Candida tepae Grinbergs (1967)

Candida valida (Leberle) Van Uden et Buckley (1970)

Candida vini Van Uden et Buckley (1970)

3 - Genre *Cryptococcus*

Cryptococcus albidus (Saito) Skinner (1947)

Cryptococcus hungaricus (Zsolt) Phaff et Fell (1970)

Cryptococcus laurentii (Kufferath) Skinner (1947)

4 - Genre *Kloeckera*

Kloeckera apiculata (Reess Emend. Kloecker) Janke (1928)

5 - Genre *Rhodotorula*

Rhodotorula glutinis (Fresenius) Harrison (1928)

Rhodotorula minuta (Saito) Harrison (1928)

Rhodotorula rubra (Demme) Lodder (1934)

6 - Genre *Trichosporon*

Trichosporon cutaneum (De Beurm, Gougerot et Vaucher) Ota (1926)
Trichosporon sp.

B - HYPHOMYCÈTES

Geotrichum

- MICROFLORE ASSOCIÉE:

Penicillium
Mucorales

La figure 5 indique les espèces de levures isolées des substrats caractéristiques obtenus lors des principales étapes du traitement des ordures. Les espèces sont classées selon leur fréquence.

DISCUSSION

On peut noter que la quantité de levures présentes dans le digestat et l'affinat est moins importante que celle observée dans les ordures ménagères (Fig. 4). En effet le digestat en comporte de 200 à 7600, le pressat de 150 à 1000 et l'affinat de 0 à 100.

Ainsi observe-t-on que la quantité de levures diminue durant le traitement. Il semble probable que les conditions anaérobies de la méthanisation (21 jours de temps de rétention dans le digesteur) jouent un rôle sur cette diminution. La température de digestion (37, 38°C) peut aussi avoir une influence sur l'élimination de quelques espèces.

Dans les cas du digestat pressé et de l'affinat, le principal paramètre inhibiteur est la quantité d'eau. En effet, la matière sèche est alors comprise entre 60 et 63%, elle est seulement de 30% dans le digestat.

La quantité de levures dans le compost âgé de huit semaines est relativement stable: elle est toujours située entre 10000 et 50000 levures (par g de poids frais). La phase thermique du compostage est alors terminée: nous observons un équilibre écologique à cette étape de maturation. La présence d'une population de levures plus importante que dans le digestat peut être attribuée à l'aération et à l'acidification du milieu, consécutive aux fermentations qui président à la production du compost. Signalons toutefois que durant la phase de montée initiale de la température du compost (jusque 170° pendant plusieurs dizaines d'heures), l'ensemble de la population microbienne diminue considérablement. Ensuite on observe une recolonisation progressive du milieu avec la descente en température et la maturation du compost.

Notre étude ne nous a pas permis d'avoir une analyse cinétique du phénomène puisque les échantillons examinés étaient âgés de 8 semaines.

La figure 5 montre la distribution des espèces trouvées dans les différents échantillons selon leur origine: les levures blanches particulièrement celles du genre *Candida* sont les plus fréquentes; parmi celles-ci on trouve *Candida lambica*, *C. famata*, *C. lipolytica*, *C. haemulonii*, *C. valida* et une ascosporogène *Saccharomyces cerevisiae*.

Nous trouvons seulement trois espèces colorées, la plus importante étant *Rhodotorula rubra*. Nous observons aussi la présence relativement constante de *Geotrichum* sp.

Figure 5: espèces de levures isolées des différents substrats analysés.
Figure 5: yeast species isolated from the different analyzed substrates.

	OM	D	P	A	A1	C
LEVURES FRÉQUENTES						
Candida famata	*	*		*	*	*
Candida lambica	*		*	*	*	
Geotrichum	*		*	*	*	
Rhodotorula rubra	*		*	*		*
Candida haemulonii	*		*	*	*	
Candida lipolytica	*	*				*
Saccharomyces cerevisiae	*					*
Candida valida	*			*	*	
Candida pintolopesii	*			*		
Candida ingens	*			*		
Candida krusei	*				*	
Candida sake				*	*	
Rhodotorula minuta	*					
Cryptococcus hungaricus	*	*				
Cryptococcus laurentii	*	*				
AUTRES LEVURES						
Brettanomyces custersianus	*					
Candida azyma						*
Candida catenulata	*					
Candida curvata						*
Candida diddensiae						*
Candida domercqii	*					
Candida ernobii	*					
Candida fermenticarens	*					
Candida globosa	*					
Candida holmii	*					
Candida inconspicua	*					
Candida intermedia	*					
Candida ishiwadae		*				
Candida kefyr					*	
Candida maltosa	*					
Candida membranaefaciens						*
Candida mogii	*					
Candida parapsilosis	*					
Candida rhagii				*		
Candida rugosa	*					
Candida salmonicola				*	*	
Candida silvicola				*		
Candida sp.						*
Candida tepae			*			
Candida vini	*					
Cryptococcus albidus						*
Kloeckera apiculata	*					
Pichia membranaefaciens	*					
Rhodotorula glutinis						*

SYMBOLES: OM: ordures ménagères, D: digestat, P: digestat pressé, A: affinat (digestat affiné juste produit), A1: affinat (digestat affiné âgé d'un mois), C: compost âgé de huit semaines.

SYMBOLS: OM: Urban Wastes, D: Digestate, P: Pressed digestate, A: Affinat (Refined digestate just produced), A1: Affinat (One month-old-refined digestate), C: Eight-week-old compost.

Quelques observations sur les levures les plus fréquentes peuvent être faites:

- *Candida lambica* (= *Pichia fermentans*) est la plus fréquemment isolée. En accord avec les auteurs américains (Skinner et al., 1980) *P. fermentans* est trouvée en grande quantité sur des fruits en décomposition. Cette levure formant un film sur les tissus nécrosés est très largement utilisée en tant que nourriture d'espèces sauvages de Drosophiles (Rose & Harrison, 1987). Aussi *C. lambica* peut donc se trouver facilement dans les ordures ménagères et à tous les stades du procédé.

- *Candida famata* (= *Torulopsis famata*) et son télomorphe *Debaryomyces hansenii* sont les espèces les plus communes de l'écosystème marin. Les facteurs tels que son caractère homothallique, son mode de formation des ascospores, sa tolérance au sel, sa capacité d'utiliser de nombreuses sources de carbone, lui permettent certainement cette distribution ubiquiste. Cette levure est aussi xérotolérante (Rose & Harrison, 1987). Pour Skinner (Skinner et al., 1980) *D. hansenii* peut se développer lentement en absence d'oxygène. Cette possibilité explique sa présence constante dans le digestat.

- *Candida lipolytica*, *Candida haemulonii* et *Candida valida* furent souvent isolées du sol, de produits laitiers, de fruits ou de crachats humains. Bien que *Candida haemulonii* ait été isolé du biotope marin, il a été trouvé dans les ordures ménagères, le digestat pressé et l'affinat.

Cependant en considérant les espèces les plus fréquemment trouvées aussi bien dans les ordures ménagères que dans le digestat, *Candida famata* et *Candida lipolytica* sont capables de fermenter des glucides, et curieusement *Cryptococcus hungaricus* et *Cryptococcus laurentii*, levures ubiquistes, hôtes de la phyllosphère, fruits et jus de toutes sortes, ne le sont pas.

- Les seules espèces sporogènes isolées sont *Saccharomyces cerevisiae* et *Pichia membranaefaciens*.

- Dans les ordures ménagères, *Candida albicans*, indicateur de pollution humaine n'est pas detecté dans les différents échantillons bien que les ordures constituent pourtant un excellent biotope et malgré l'utilisation d'un milieu spécial tel que "Biggy-agar" (Hinzelin & Lectard, 1979) préconisé pour la détection de cette levure. Quant à *Trichosporon cutaneum*, il n'est rencontré que très sporadiquement. En effet il n'a été mis en évidence que dans deux échantillons d'ordures ménagères triées.

BIBLIOGRAPHIE

DORFMANN R. and BATSCH G., 1985 - *Les résidus urbains - "Traitement et valorisation"*, 2ème éd., Vol. 2. Assoc. Gén. Hygiénistes et Techniciens Municipaux. Paris, Lavoisier Techn. et Doc.

HINZELIN F. et LECTARD P., 1979 - Les levures dans les stations d'épuration des eaux usées. *Mycopathologia* 69: 121-127.

JACOB J.F., PERRIER J. et DESBOIS S., 1986 - *Unité de méthanisation d'ordures ménagères de la Buisse (Société VALORGA) Bilan de fonctionnement.* Rapport d'expertise AFME-ANRED, 118 p.

KREGER VAN RIJ N.J.W., 1984 - *The yeast - A taxonomic study.* Third ed. Amsterdam, Elsevier Sci. Pub.

PERRIER J., JACOB F. et DESBOIS S., 1988 - Ordures ménagères: la méthanisation atteint la maturité industrielle. *Biofutur* 74: 30-34.

ROSE A.H. and HARRISON J.S., 1987 - *The Yeasts* - vol. 1: *Biology of Yeasts*. vol. 2: *Yeasts and Environment*. London, Academic Press.

SEGURA J., 1984 - Le compostage des ordures ménagères et ses débouchés agronomiques. *Biofutur* 21: 19-29.

SKINNER F.A., PASSMORE S.M. and DAVENPORT R.P., 1980 - *Biology and activity of yeasts*. London, Academic Press.